

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005 年 7 月 14 日 (14.07.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/063814 A1

- (51) 国際特許分類: C07K 14/805 (74) 代理人: 小林 浩, 外(KOBAYASHI, Hiroshi et al.); 〒1040028 東京都中央区八重洲二丁目 8 番 7 号 福岡ビル 9 階 阿部・井窪・片山法律事務所 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2004/019822
- (22) 国際出願日: 2004 年 12 月 27 日 (27.12.2004) (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2003-433548
2003 年 12 月 26 日 (26.12.2003) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社オキシジェニクス (OXYGENIX CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1050001 東京都港区虎ノ門 4-1-1 虎ノ門パストラル本館 6 階 Tokyo (JP). 学校法人早稲田大学 (WASEDA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1698050 東京都新宿区戸塚町 1 丁目 104 番地 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 武岡 真司 (TAKEOKA, Shinji) [JP/JP]; 〒1580094 東京都世田谷区玉川 3-40-16-404 Tokyo (JP). 土田 英俊 (TSUCHIDA, Eishun) [JP/JP]; 〒1770053 東京都練馬区関町南 2-10-10 Tokyo (JP). 宗慶太郎 (SOU, Keitaro) [JP/JP]; 〒1710031 東京都豊島区目白 3-13-18-402 Tokyo (JP).
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
— 請求の範囲の補正の期限前の公開であり、補正書受領の際には再公開される。
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PROCESS FOR PURIFICATION OF HEMOGLOBIN

(54) 発明の名称: ヘモグロビン精製法

(57) Abstract: A process for purification of hemoglobin from red blood cells, characterized by subjecting red blood cells to cryopreservation prior to the purification.

(57) 要約: 本発明は、赤血球からヘモグロビンを精製するにあたり、赤血球を凍結保存させた後に精製することを特徴とするヘモグロビンの精製方法を提供する。



WO 2005/063814 A1

明 細 書

ヘモグロビン精製法

5 技術分野

本発明は、赤血球からヘモグロビン(Hb)を精製する方法において、特に Hb の変性や劣化を起こさず、高収率で安定して Hb を確保するために赤血球を凍結、冷凍保管する工程を含む方法に関するものである。

10 背景技術

赤血球から単離・精製したヘモグロビン (Hb) は、赤血球代替物の原料として使用できる。このため、一定規格を満足できるヘモグロビン原料を安定に得る方法が求められている。通常、赤血球は冷蔵保管 (4℃) されるが、採血により体外に取出された赤血球は、時間とともに各種化学変化 (溶血、膜成分変性、代謝産物生成、Hb 酸化、雑菌繁殖など) の進行により劣化していくため、高純度 Hb を得ることが困難になる。

特に、酸素輸送の役割を担う Hb は、ヘム中心鉄が二価 (Fe^{2+}) の場合に限り酸素を結合解離できるが、酸素解離に伴う電子移動 (自動酸化)、あるいは活性酸素など何らかの外的因子により中心鉄が三価 (Fe^{3+} 、metHb) に酸化されると酸素結合能を消失し、Hb 原料として使用できなくなる (これをメト化という)。赤血球内ではメト化ヘモグロビン (metHb) は還元酵素類により速やかに還元され、その原因となる活性酸素はスーパーオキシドディスムターゼやカタラーゼなどの酵素により消去されるため、metHb 濃度は低値に保持されているが、この機能も冷蔵保存 (4℃) 中に劣化していき、metHb の蓄積が進行する。従って、赤血球から Hb を精製する方法には、採血後一定期間内に簡単、安価な方法で Hb を酸化され難い環境に移行する工程が必要となり、この移行までの期間、環境条件設定が不可欠となる。赤血球から Hb を精製する方法は公知となっているものもある (特開平 9-12598 号公報、特表 2002-520338 号公報) が、これら方法の前提

となる赤血球の取扱いに関する工程は全く含まれておらず、もちろん、その際の条件設定はなされていない。更には、人から採血した血液のうち、保管期限が経過したもの（日本では 3 週間）を利用する場合には、保管期限の経過後の品質管理はより困難となる。また、赤血球のような細胞構造を有する物質の凍結は、保護剤の添加なしには困難とされていた（特表 2 0 0 2 - 5 1 6 2 5 4 号公報）。しかも保護剤の添加や除去は操作が煩雑となるため、大量精製工程には適さない。

発明の開示

10 このような状況では、得られる精製 Hb の性状が、原料として使用する赤血球の保管条件や保管期間に大きく影響を受けるため、その品質が安定しない問題があった。精製 Hb を安定的に得るためには、赤血球の状態のまま管理する工程を含めた Hb 精製法の確立が必要となる。

15 本発明者らは、上記実状に鑑み、鋭意検討を行なった結果、赤血球を凍結保存させた後に精製すると、赤血球に含まれる Hb が安定に保持されることを見出した。また、洗浄赤血球についてこの凍結を行うことを条件として、Hb 収量の低下も防止できた。このような工程が含まれる Hb 精製法によれば、赤血球の使用期限が飛躍的に増大し、かつ安定した性状の精製 Hb が得られることが見出され、本発明に到った。

20 すなわち、本発明は、赤血球からヘモグロビンを精製するにあたり、赤血球を凍結保存させた後に精製することを特徴とするヘモグロビンの精製方法である。

25 また、前記方法は、凍結保存工程が、採血された赤血球を 4℃～10℃で保存する工程、赤血球を洗浄する工程、洗浄赤血球を凍結する工程及び凍結された赤血球を冷凍保存する工程を含んでいてもよい。

赤血球を採血してから凍結する工程までの日数は、例えば 1～60 日である。

さらに、凍結する工程及び冷凍保存する工程における温度は、例えば -60℃以下である。

本発明により、赤血球からヘモグロビンを精製するにあたり、赤血球を凍

結保存させた後に精製することを特徴とするヘモグロビンの精製方法が提供される。本発明のヘモグロビンの精製方法により、赤血球の使用期限が飛躍的に増大し、かつ安定した性状の精製 Hb が得られる。

5 以下に、本発明を詳細に説明する。

本発明において、赤血球は各種動物（ヒト、ウシ、ウマ、ブタなどが挙げられるが、限定されるものではない）由来の血液より得られ、好ましくは、採血後に遠心分離、限外濾過、膜濾過、またその組み合わせにより白血球、血小板、血漿成分の大部分が除去された赤血球分散液が用いられる。献血によって得られた血液から遠心分離によって血漿成分を除去し、安定化剤として MAP 液を添加した濃厚赤血球製剤である赤血球 M.A.P.のうち、その保管期限（採血後 21 日間）が経過したものが使用される。ここで、MAP 液とは、主としてマンニトール、アデニン、結晶リン酸二水素ナトリウムを含む溶液であり、赤血球 M.A.P.とは、赤血球生存率の向上を図るため、濃厚赤血球液中の抗凝固剤である CPD（citrate phosphate dextrose）を除いてこの MAP 液に置換したものである。

赤血球を冷蔵保管する工程は 4～10℃が好ましく、通常の冷蔵庫、血液保冷庫、保管庫などの何れを用いてもよい。4℃より低温で保管して凍結した場合、還元酵素機能不能による metHb（メト化ヘモグロビン）の蓄積、また、赤血球溶血により次の洗浄工程での Hb 収率低下などの問題が生じ、また 10℃より温度が上昇した場合は、metHb 生成、各種代謝産物の生成、雑菌の繁殖など、劣化が加速されるので好ましくない。

赤血球を洗浄する工程は、赤血球と残存する白血球、血小板、血漿成分、また保存中に生成した水溶性物質を分離できる何れの方法を用いてもよく、例えば遠心分離、限外濾過、膜濾過、またその組み合わせが挙げられる。洗浄後の赤血球は、遠心分離により得られる赤血球ペレットあるいは晶質浸透圧を赤血球と同等にした溶液に分散させてもよいが、ヘモグロビン精製工程で除去が困難な添加物は避けるべきである。赤血球 M.A.P.の場合には、期限が経過した後に、各血液センターや病院にて、採血バッグに生理食塩水を注

入後分散させてバッグ毎高速遠心分離を行うことにより、バフィーコート（白血球と血小板の層）を含めた上清を除去する操作を 2 回から 4 回繰り返し、最終的には濃厚赤血球の状態とするのが好ましい。

5 洗浄赤血球を -60°C 以下で凍結する工程は、適当な冷媒中への浸漬、冷媒噴霧、冷凍庫、保冷庫などの何れを用いてもよく、特に急速凍結には液体窒素や -80°C の冷凍庫、噴霧凍結などが有効である。赤血球 M.A.P.の場合はバッグ毎に凍結させればよい。本発明においては、赤血球を採血してから凍結する工程までの日数は、例えば 1~60 日である。

10 冷凍保管は適当な冷媒中への浸漬、冷媒噴霧、冷凍庫など何れの方法を用いてもよい。凍結により Hb の高次構造が変化した状態で、結合水が凍結していない場合には、metHb の生成が促進される場合があるので、 -60°C 以下で実施することが好ましい。赤血球 M.A.P.の場合には、凍結させた状態でヘモグロビンを精製する箇所に収集させてもよい。

15 ヘモグロビン精製法は、何れの方法を用いてもよく、例えば常法によって溶血し、遠心分離や限外濾過によりストローマ成分のみを除去したストローマフリーヘモグロビン溶液、ヘモグロビンを単離した精製ヘモグロビン溶液として得られる。

20 上記精製法において、限外濾過は、例えば限外分子量 70k~1000kDa、好ましくは 500 kDa の限外濾過膜を用いることができる。ストローマ成分を除去した溶液は、必要により脱気および一酸化炭素ガス通気を行い、98%以上カルボニル Hb に変換させることが好ましい。その後、Hb 溶液を恒温槽中で攪拌し、次いで所定の遠心速度で遠心分離し、沈殿した変性夾雑蛋白質を除去する。得られた溶液を限外濾過することにより、透過液として精製ヘモグロビン溶液を得ることができる。

25

以下に実施例を挙げて本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらにより限定されるものではない。

〔実施例 1〕赤血球 M.A.P. の保存形態の比較

日本赤十字血液センターより提供された保管期限が経過した赤血球 M.A.P. 200ml バッグ（採血後 27 日経過）から約 140 mL を取り出して遠沈管に入れ、4℃にて遠心分離（2,000×g、15 分）を行い、バフィーコートを含めた上清を除去した。更に生理食塩水 70 mL を添加して攪拌した後、遠心分離を行い洗浄した。この操作を四回繰り返して濃厚赤血球を得た。この濃厚赤血球をポリエチレン容器に 3 mL ずつ分注して、冷蔵庫（4℃）、冷凍庫（-20℃）、あるいはディープフリーザー内（-80℃）で保存した。その後、所定日数が経過した試料を 4℃の冷蔵庫内で解凍して、シアノメトヘモグロビン法によりメトヘモグロビン含有率（メト化率）を測定した。得られた結果を表 1 に示す。冷蔵庫（4℃）および冷凍庫（-20℃）で保存した場合には、日数経過に伴いメト化率の上昇が認められ、特に-20℃では凍結から 14 日後に 37.1%という著しい上昇が認められた。他方、ディープフリーザー（-80℃）内で保存した場合には 3 ヶ月経過後でもメト化率の上昇は認められなかった。

表 1 赤血球の保存温度とメト化率推移

採血後期間（日）	27	28	41	58	87	117
凍結期間（日）	0	1	14	31	60	90
保管温度	メト化率（%）					
4℃	0	0	0.7	2.8	15.9	35.5
-20℃	0	5.1	37.1	N.D.	N.D.	N.D.
-80℃	0	0.7	0.7	0.9	0.8	0.9

〔実施例 2〕 赤血球 M.A.P. の冷蔵保存温度

日本赤十字血液センターより提供された保管期限が経過した赤血球 M.A.P. を 4℃にて冷蔵保存し、採血日から数えて 27 日経過した時点で分注し、4、10、15、あるいは 20℃の保冷库内で保存した。採血日から数えて 58 日経過した試料について、シアノメトヘモグロビン法によりメトヘモグロビン含有率（メト化率）を測定した。4 および 10℃で保存した場合のメト化率は各々 2.8 および 6.4%であったが、15 および 20℃の場合は、13.2 および 18.3%まで上昇が認められた。10℃以下で保存した場合は、少なくとも採血後 60 日までのメト化率は 10%以下に留まった。

〔実施例 3〕 赤血球 M.A.P. の冷蔵保存期間

日本赤十字血液センターより提供された保管期限が経過した赤血球 M.A.P. を 4℃ にてバッグのまま冷蔵保存し、採血日から数えて 27、 41、 58、 あるいは 87 日経過した時点で約 140 mL ずつ取り出し、遠沈管に移して遠心分離（2,000×g、15 分）を行い、パフィーコートを含めた上清を除去した。更に生理食塩水 70 mL を添加して攪拌した後、遠心分離により洗浄した。この操作を三回繰り返して濃厚赤血球を得た。この濃厚赤血球をポリエチレン容器に 3 mL ずつ分注して、ディープフリーザー内（-80℃）で保存した。その後、所定日数が経過した試料を 4℃ の冷蔵庫内で解凍して、シアノメトヘモグロビン法によりメトヘモグロビン含有率（メト化率）を測定した。得られた結果を表 2 に示す。4℃ では、保存期間が長くなるにつれて凍結解凍後のメト化率は上昇することが明らかになった。これにより、解凍時のメト化率の上限を 10% 程度とした場合、採血してから凍結するまでの日数は 60 日以内が適していると判断された。

表 2 赤血球の冷蔵保存期間による凍結解凍後のメト化率への影響

凍結期間（日）	0	1	7	14	31	60
冷蔵保存期間（日）	メト化率（%）					
27	0	0.7	0.8	0.7	0.9	0.9
41	0.7	4.6	4.2	4.4	4.4	4.6
58	2.8	8.3	8.5	8.8	9.0	9.5
87	12.3	20.5	21.2	21.8	22.3	22.6

〔実施例 4〕 凍結赤血球 M.A.P. からの Hb 精製方法

日本赤十字血液センターより提供された赤血球 M.A.P.（採血後 28 日経過）400 mL バッグを液体窒素に 10 分間浸漬して凍結させ、次いで冷凍庫（-80℃）にて 60 日間保存した後、冷蔵庫内（4℃）で解凍した。この解凍赤血球について、4℃ にて遠心分離（2,000×g、15 分）を行ったところ、上清は濃赤色を呈しており、凍結融解操作による赤血球の溶血が認められた。バフ

イーコートを含めた上清を除去した後、更に生理食塩水 140 mL をバッグに添加して攪拌後、遠心分離して洗浄した。この操作を四回繰り返して濃厚赤血球を得た。このとき、シアノメトヘモグロビン法により求めたメト化率は 1.3% で、ヘモグロビン収率は 63% であった。

- 5 次に、濃厚赤血球をポリエチレンの容器に移し、等容量の注射用水を添加して赤血球を低張溶血させ、限外濾過（限外分子量: 1000 kDa）を行い、ストローマ成分を除去した。この溶液に脱気および一酸化炭素ガス通気を 5 回繰り返して、98% 以上カルボニル Hb に変換させた。このカルボニル Hb 溶液を 60℃ の恒温槽中で 12 時間攪拌し、次いで遠心分離（3,000×g、30 分）により沈殿した変性夾雑蛋白質を除去した。得られた溶液を限外濾過（限外分子量: 1000 kDa）を行うことにより、透過液として精製ヘモグロビン溶液を得た。この方法で得られた Hb 溶液の性状を表 3 に示す。

表 3 凍結赤血球 M.A.P. から精製した Hb 溶液の性状

項目	測定値
Hb 濃度 (g/dL)	7
HbCO (%)	97
MetHb (%)	2.3
Hb 中蛋白純度 (%)	> 99.9
脂質残存率 (%)	< 0.01
Hb 収率 (%)	55

15

〔実施例 5〕 凍結洗浄赤血球からの Hb 精製方法

- 日本赤十字血液センターより提供された赤血球 M.A.P.400ml バッグを 4℃ にて保存し、採血日から数えて 30 日目に生理食塩水 140 mL を添加してバッグのまま 4℃ にて遠心分離（2,000×g）を行い、パフィーコートを含む上層を除去した。この場合には赤血球の溶血は認められなかった。更に生理食塩水 140 mL をバッグに添加して遠心分離する操作を三回繰り返して濃厚赤血球を得た。次に、バッグのまま液体窒素に浸漬して凍結させ、冷凍庫（-80℃）にて 60 日間保存した後、この凍結濃厚赤血球を冷蔵庫内（4℃）で解凍した。このとき、シアノメト法により求めたメト化率は 0.9%、ヘモグロ

ビン収率は 90%であった。

次に、解凍した濃厚赤血球をバッグからポリエチレン容器に移した後、等容量の注射用水を添加して赤血球を低張溶血させ、限外濾過（限外分子量：1000 kDa）を行うことによりストローマ成分を除去した。次に、この溶液に

5 脱気および一酸化炭素ガス通気を 5 回繰り返して、98%以上カルボニル Hb に変換させた。このカルボニル Hb 溶液を 60℃の恒温槽中で 12 時間攪拌し、次いで遠心分離（2,000×g、30 分）を行い、沈殿した変性夾雑蛋白質を除去した。得られた溶液を限外濾過（限外分子量：1000 kDa）により、透過液として精製ヘモグロビン溶液を得た。この方法で得られた Hb 溶液の性状を表

10 4 に示す。

表 4 凍結洗浄赤血球から精製した Hb 溶液の性状

項目	測定値
Hb 濃度 (g/dL)	7
HbCO (%)	96
MetHb (%)	1.9
Hb 中蛋白純度 (%)	> 99.9
脂質残存率 (%)	< 0.01
Hb 収率(%)	80

〔実施例 6〕 凍結洗浄赤血球からの Hb 精製方法

15 日本赤十字血液センターより提供された赤血球 M.A.P.を 4℃にて保存し、採血日から数えて 36 日目にバッグからポリエチレン容器に移した 10 L を 4℃にて遠心分離（2,000×g）して、バフィーコートを含めた上清を除去した。この場合、左程赤血球の溶血は認められなかった。更に生理食塩水 5 L を添加して攪拌した後、遠心分離を行うことにより洗浄した。この操作を四

20 回繰り返して濃厚赤血球を得た。次に、濃厚赤血球を冷凍庫（-80℃）にて凍結させ、そのまま 30 日間保存した後、この凍結洗浄赤血球を冷蔵庫内（4℃）で解凍した。このとき、シアンメト法により求めたメト化率は 0.7%、ヘモグロビン収率は 93%であった。

次に、濃厚赤血球に等容量の注射用水を添加して赤血球を低張溶血させ、

- 限外濾過（限外分子量：1000 kDa）にてストローマ成分を除去した。次に、この溶液に脱気および一酸化炭素ガス通気を 5 回繰り返す、98%以上カルボニル Hb に変換させた。このカルボニル Hb 溶液を 60℃の恒温槽中で 12 時間攪拌し、次いで遠心分離（2,000×g、30 分）を行うことにより、沈殿した
- 5 変性夾雑蛋白質を除去した。この溶液に 0.1N の水酸化ナトリウム溶液を添加し、溶液 pH を 7.4 に調節した。得られた溶液を限外濾過（限外分子量：1000 kDa）し、透過液として精製ヘモグロビン溶液を得た。この溶液を限外濾過（限外分子量：8 kDa）することにより、濃厚 Hb 溶液を得た。この方法で得られた Hb 溶液の性状を表 5 に示す。

10 表 5 凍結洗浄赤血球から精製した濃厚 Hb 溶液の性状

項目	測定値
Hb 濃度 (g/dL)	41
HbCO (%)	98
MetHb (%)	2.0
Hb 中蛋白純度 (%)	> 99.9
脂質残存率 (%)	< 0.01
Hb 収率(%)	78

産業上の利用可能性

- 本発明により、ヘモグロビンの精製法が提供される。本発明の方法によれば赤血球を凍結保存させた後に精製すると、赤血球に含まれる Hb が安定に保持されるため、赤血球の使用期限が飛躍的に増大する。従って、本発明は救急医療分野等において極めて有用である。
- 15

請 求 の 範 囲

1. 赤血球からヘモグロビンを精製するにあたり、赤血球を凍結保存させた後に精製することを特徴とするヘモグロビンの精製方法。
- 5 2. 凍結保存工程が、採血された赤血球を 4℃～10℃で保存する工程、赤血球を洗浄する工程、洗浄赤血球を凍結する工程及び凍結された赤血球を冷凍保存する工程を含む請求項 1 記載の方法。
3. 赤血球を採血してから凍結する工程までの日数が 1～60 日である請求項 2 記載の方法。
- 10 4. 凍結する工程及び冷凍保存する工程における温度が－60℃以下である請求項 2 又は 3 記載の方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/019822

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C07K14/805

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ C07K14/805

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 00/02921 A1 (BIOPURE CORP.), 20 January, 2000 (20.01.00), Full text & AU 9947003 A & US 6150507 A & EP 1097171 A1 & CN 1308636 A & JP 2002520338 A & NZ 509257 A	1-4
Y	JP 9-12598 A (Sekisui Chemical Co., Ltd.), 14 January, 1997 (14.01.97), Full text (Family: none)	1-4
Y	JP 10-17597 A (BML, Inc.), 20 January, 1998 (20.01.98), Full text (Family: none)	1-4

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
06 April, 2005 (06.04.05)

Date of mailing of the international search report
17 May, 2005 (17.05.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/019822

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DI, IORIO, EE. Preparation of derivatives of ferrous and ferric hemoglobin, Methods Enzymol (1981), Vol.76, pages 57 to 72	1-4
Y	Shinji YUASA, "Chokikan (20 Nen Ijo) Toketsu Hozon shita Sekkekkyu no Kento", Japanese Journal of Transfusion Medicine, Vol.45, No.6, pages 854 to 855, 1999	1-4
Y	Shinji YUASA et al., "Choki Toketsu Hozon shita Sekkekkyu no in vitro Kino Hyoka", Koseisho Ketsueki Kenkyu Jigyo Heisei 6 Nendo Kenkyu Hokokushu, pages 174 to 177, 1995	1-4
Y	LUKASIAK, S. et al., Glutathione reductase and methahemoglobin reductase in erythrocytes stored at -80°C and -196°C Prog.Refrig.Sci. Technol. (1980), Vol.3, pages 163 to 167	1-4
Y	Shin'ichi UEDA et al., "Togai Hogoza o Mochiinai Chokyusoku Toketsu ni yoru Sekkekkyu no Toketsu Hozon", Toketsu Oyobi Kanzo Kenkyukai Kaishi, Vol.36, pages 97 to 104, 1990	1-4

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. ⁷ C07K14/805			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. ⁷ C07K14/805			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) MEDLINE(STN), WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG), JSTPlus(JOIS)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示		関連する 請求の範囲の番号
Y	WO 00/02921 A1 (BIOPURE CORP) 2000.01.20, 全文 & AU 9947003 A & US 6150507 A & EP 1097171 A1 & CN 1308636 A & JP 2002520338 A & NZ 509257 A		1-4
Y	JP 9-12598 A (積水化学工業株式会社) 1997.01.14, 全文 (ファミリーなし)		1-4
Y	JP 10-17597 A (株式会社ビー・エム・エル) 1998.01.20, 全文 (ファミリーなし)		1-4
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 06.04.2005		国際調査報告の発送日 17.5.2005	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 左海 匡子 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	4N 3038

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	DI, IORIO, EE. Preparation of derivatives of ferrous and ferric hemoglobin, Methods Enzymol (1981) Vol. 76, p. 57-72.	1 - 4
Y	湯浅晋治, 長期間 (20年以上) 凍結保存した赤血球の検討, 日本輸血学会雑誌, 第45巻第6号第854-855頁, 1999	1 - 4
Y	湯浅晋治ほか, 長期凍結保存した赤血球の in vitro 機能評価, 厚生省血液研究事業 平成6年度研究報告集, 第174-177頁, 1995	1 - 4
Y	LUKASIAK, S. et al., Glutathione reductase and methahemoglobin reductase in erythrocytes stored at -80°C and -196°C Prog Refrig Sci Technol (1980) Vol. 3, p. 163-167	1 - 4
Y	上田進一ほか, 凍害保護剤を用いない超急速凍結による赤血球の凍結保存, 凍結及び乾燥研究会会誌, 第36巻第97-104頁, 1990	1 - 4